방사선조사가 *Porphyromonas gingivalis*에 미치는 영향

경희대학교 치의학전문대학 구강악안면방사선학교실 및 구강생물학연구소
이창환 · 김규태 · 최용석 · 황의환

Effect of irradiation on the *Porphyromonas gingivalis*

Chang-Hwan Lee, Gyu-Tae Kim, Yong-Suk Choi, Eui-Hwan Hwang
Department of Oral and Maxillofacial Radiology, School of Dentistry and Institute of Oral Biology, Kyung Hee University

ABSTRACT

Purpose : The aim of this study was to observe a direct effect of irradiation on the periodontopathic *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*).

Materials and Methods : *P. gingivalis* 2561 was exposed to irradiation with a single absorbed dose of 10, 20, 30, and 40 Gy. Changes in viability and antibiotic sensitivity, morphology, transcription, and protein profile of the bacterium after irradiation were examined by pour plating method, disc diffusion method, transmission electron microscopy, RT-PCR, and immunoblot, respectively.

Results : Viability of irradiated *P. gingivalis* drastically reduced as irradiation dose was increased. Irradiated *P. gingivalis* was found to have become more sensitive to antibiotics as radiation dose was increased. With observation under the transmission electron microscope, the number of morphologically abnormal cells was increased with increasing of irradiation dose. In RT-PCR, decrease in the expression of *fimA* and *sod* was observed in irradiated *P. gingivalis*. In immunoblot, change of profile in irradiated *P. gingivalis* was found in a number of proteins including 43-kDa fimbrillin.

Conclusion : These results suggest that irradiation may affect the cell integrity of *P. gingivalis*, which is manifested by the change in cell morphology and antibiotic sensitivity, affecting viability of the bacterium. (***Korean J Oral Maxillofac Radiol 2008; 38 : 39-47***)

KEY WORDS : Radiotherapy; Xerostomia; Periodontal diseases: *Porphyromonas gingivalis*

서 론

타액은 구강 내 잔류물을 세정해주는 자정작용, 원활한 저작, 발음 및 연하를 위한 윤활작용, 구강 내 미생물에 의해 생성된 산을 중화시키는 완충작용 등과 같이 다양한 구강기능을 수행하는데 있어 매우 중요한 역할을 담당하고 있으며, 치아 표면의 재광화에 필요한 무기질, 구강점막을 보호하는데 필요한 면역글로불린과 같은 항체, 살균과 정균작용에 관여하는 리소자임, 락토페린, sialoperoxidase와 같은 항미생물효소를 함유하고 있어 구강균총의 구성과 구강의 항상성 유지에 영향을 미치는 가장 중요한 요소 중의 하나이다.[1-3] 그러나 타액선질환, 당뇨병, 호르몬장애가 발생하거나, 이뇨제, 항고혈압제 등과 같은 약물복용, 두경부 방사선치료를 시행한 경우에는 타액의 분비감소가 유발되며, 이로 인해 연하곤란, 미각장애, 점막염, 다발성 치아우식증, 치주조직의 파괴 등의 부작용이 발현된다.[4-6] 특히, 두경부 방사선치료 시에는 타액선이 이의 해부학적 위치와 크기로 인해 방사선조사야에 자주 포함되는데,[7,8] 타액선에 방사선이 조사되면 타액의 분비 감소와 더불어 타액의 점조도, 수소이온 농도지수 및 유기질과 무기질 성분의 변화가 초래되고, 리소자임과 같은 항균물질이 결핍되어 구강 내 특정 미생물군의 수와 특성, 미생물군간의 구성비율의 변화가 나타나며,[9-12] 이로 인해 미생물 관련 질환인 치아우식증, 치은염, 치주염, 점막염 등의 발병이 증가됨으로써 높은 치아 상실률을 보이게 된다.[13-16] Brown 등,[17] Beumer 등[18]은 방사선유발 구강건조증이 발생되면 특정 미생물의 현저

접수일 : 2007년 11월 14일; 심사일 : 2007년 11월 15일; 채택일 : 2007년 12월 20일
Correspondence to : Prof. Eui-Hwan Hwang
Department of Oral and Maxillofacial Radiology, School of Dentistry, Kyung Hee University, 1 Hoigi-dong, Dongdaemun-gu, Seoul 130-701, Korea
Tel) 82-2-958-9405, Fax) 82-2-965-1256, E-mail) hehan@khu.ac.kr

한 증가가 동반되어 나타나는데, 특히, *Streptococcus mutans, Lactobacillus, Staphylococcus, Candida* 등과 같은 산생성 미생물과 *Actinomyces*의 수는 증가하는 반면, *Streptococcus sanguis, Neisseria, Fusobacterium*의 수는 감소하며, 이러한 구강균총의 변화는 방사선치료 후에도 상당한 기간 동안 지속된다고 하였다. 또한 Lacatus 등[10]은 두경부 방사선치료 환자의 89%에서 다발성 치아우식증이 관찰되었고, 이의 주된 요인은 방사선에 의한 구강균총의 변화 때문이라고 하였다. Llory 등[19]은 방사선유발 구강건조증 환자의 치태에서 *Actinomyces*의 비율이 방사선조사 전 18%에서 방사선조사 후 28%로 증가되었으며, 이러한 *Actinomyces*의 증가는 치주조직의 파괴와 밀접한 관련이 있다고 하였다.

한편 두경부 방사선치료 시에는 방사선이 치아우식증의 진행에 직접적인 영향을 미치지 않으나,[20] 방사선에 노출된 치주조직은 시간이 경과됨에 따라 미세혈관계의 혈액순환이 감소하고, 충혈, 동맥내막염, 혈전증, 혈관분포의 감소, 혈관의 섬유화 등이 발생하며, 세포사와 조직 치유능력의 저하로 인해 지속적이고도 점진적인 치주조직의 파괴가 일어날 뿐만 아니라 방사선치료에 따른 가장 심각한 합병증인 방사선골괴사가 유발되기도 한다.[21-24]

최근 두경부 악성 종양의 발생률이 증가되고 방사선치료기기의 발전으로 인해 방사선치료가 이의 일차 치료법, 또는 보조 치료법으로 자주 이용되고 있으며, 이에 따라 방사선에 의해 유발되는 다양한 구강질환과 합병증에 대한 적절한 진단과 치료 및 예방의 필요성이 증대되고 있다. 특히, 두경부 방사선치료는 치은의 출혈, 치주인대의 변성, 치조골 흡수 등을 일으킬 뿐만 아니라, 구강균총의 현저한 변화를 야기하며, 이러한 구강균총의 변화는 타액의 분비 감소, 타액의 성분 변화 등과 맞물려 중증의 치주질환을 유발한다. 따라서 방사선치료 동안은 물론, 방사선치료 전과 후에도 구강기능을 저하시키고, 치아 상실의 주요 원인인 치주질환에 대한 적극적인 예방처치를 위해 치주질환유발 미생물의 방사선감수성을 숙지하는 것은 치과임상에서 의의가 있을 것으로 생각된다. 그러나 방사선이 치주조직에 미치는 영향이나 구강세정제, 항생제 등의 사용에 따른 치주질환유발 미생물의 억제 효과에 대한 연구는 활발히 진행된 바 있으나, 두경부 방사선치료 환자에서 이들 주요 병원균의 발현 양상이나 방사선이 실제 치주질환유발 미생물에 미치는 직접적인 영향에 관한 연구는 매우 드물다.

이에 본 연구에서는 치주질환의 원인균인 *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*)를 대상으로 다양한 흡수선량의 방사선을 조사한 다음, 실험균주의 생균 수와 항생제에 대한 감수성 변화를 조사하였으며, 실험균주의 구조적, 형태적 변화를 투과전자현미경과 분자생물학적 방법을 이용하여 관찰하였다.

재료 및 방법

1. 실험균주

치주질환 병원균인 *P. gingivalis* 2561를 실험균주로 채택하였다. 이를 실험목적에 따라 방사선비조사군을 대조군으로, 방사선조사군을 실험군으로 각각 나누었으며, 실험군을 다시 방사선조사선량에 따라 10 Gy 조사군, 20 Gy 조사군, 30 Gy 조사군 및 40 Gy 조사군으로 정하였다.

2. 실험방법

1) 방사선조사 전 실험균주의 배양

생균 수 측정 및 항생제 감수성 검사를 위해 실험균주를 yeast extract (5 mg/mL), hemin (5 μg/mL) 및 비타민 K1 (0.2 μg/mL)이 첨가된 brain heart infusion (BHI) 액체배지와 면양적혈구가 5% 첨가된 tryptic soy (TS) 한천배지에서 37 °C에서 24시간 혐기적으로 배양하였다. 배양된 실험균주를 새 BHI 액체배지에 희석하여 분광광도계 (Ultraspec 2000, Pharmacia Biotech, USA)로 600 nm에서 흡광도가 0.1이 되도록 균 농도를 조정하였다. 한편 투과전자현미경 및 분자생물학적 관찰을 위해서는 실험균주를 BHI 액체배지에 접종하여 37°C 혐기 배양기에서 분광광도계로 600 nm에서 흡광도가 0.4가 될 때까지 배양하였다.

2) 방사선조사

배양된 실험균주를 멸균된 100 mL 비이커에 옮긴 후 혈액방사선조사장치 (CIS Bio International, France)를 이용하여 선량률 667 cGy/min으로 10, 20, 30, 40 Gy의 흡수선량이 되도록 방사선을 1회 조사하였다.

3) 관찰항목

(1) 생균 수 측정

방사선을 조사한 직후 배양액 내 균의 농도가 균일하게 되도록 가볍게 진탕하고 나서 100 μL를 취하여 생리식염수 900 μL가 담긴 1.5 mL microcentrifuge tube에 넣고 vortex하여 10배 희석균액을 만들었다. 희석균액을 다시 100 μL 취하여 생리식염수 900 μL가 담긴 새 1.5 mL microcentrifuge tube에 넣고 vortex하는 과정을 반복하여 10^{-7}-10^{-9}까지 단계적으로 희석하였다. 단계 희석된 균액 100 μL를 TS 한천배지에 적하한 다음, 멸균된 유리밀대를 사용하여 균액을 한천배지 전면에 고루 도말하였다. 도말된 한천배지를 37°C 혐기 배양기에서 3-4일간 배양한 후 형성된 *P. gingivalis* 집락이 200개 정도로 나타난 한천배지를 선택하여 집락수를 센 다음, 이 배지에 도말했던 균액의 희석배수를 역산하여 균액 원액 100 μL당 세균 수를 계산하였다.

(2) 항생제 감수성 검사

방사선을 조사한 *P. gingivalis*의 항생제에 대한 감수성 변화를 관찰하기 위하여 disc 확산법을 시행하였다. 우선, 위에서와 같이 비이커 내에서 방사선조사선량이 다르게 조사된 각각의 *P. gingivalis* 실험균주의 생균 수가 일정하게 되도록 조절하였다. 이를 위해, 앞서 생균 수 실험을 통해 10, 20, 30, 40 Gy를 조사한 후 얻은 각각의 생균 수 결과를 토대로 생균 수가 많은 대조군과 10, 20, 30 Gy 조사군의 균액에 새 BHI 액체배지를 첨가, 희석함으로써 모든 군의 균액 생균 수가 40 Gy 조사군의 균액 내 생균 수와 동일하게 조절하였다.

항생제 감수성 검사에 앞서 예비실험을 통해 disc 확산법으로 나타난 억제환(inhibition zone)의 크기가 측정하기 용이한 20-40 mm 정도가 되도록 항생제 농도를 미리 결정하였다. 이 후, 멸균된 8 mm 직경의 paper disc에 항생제 용액을 20 μL씩 적하하여 각 paper disc 당 항생제 농도가 위에서 결정한 적정농도인 amoxicillin 4 μg, ampicillin 4 μg, cefotaxime 4 μg, penicillin 8 μg, tetracycline 8 μg이 되도록 최종농도를 조절하였다. 항생제 용액이 적하된 paper disc는 50°C 배양기에서 무균상태로 건조시켰다. 균 농도가 일정하게 조절된 *P. gingivalis* 균액을 100 μL씩 도말한 TS 한천배지에 적정농도의 항생제 disc를 올려놓은 상태로 37°C에서 혐기적으로 3-4일간 배양한 후 항생제 disc 주변에 형성된 *P. gingivalis*의 억제환 직경을 측정하였다.

(3) 투과전자현미경 관찰

방사선조사에 의한 *P. gingivalis*의 세포벽, 세포막 및 세포질 구조의 변화를 관찰하기 위해 투과전자현미경을 이용하였다. 방사선을 조사한 *P. gingivalis* 실험균주를 원심분리하여 얻은 균 pellet을 phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4)으로 세정한 후 2% glutaraldehyde와 0.2% ruthenium red로 4°C에서 1시간 동안 전고정하였고, PBS로 세정하고 2차 고정액인 2% OsO_4로 4°C에서 1시간 30분 동안 후고정하였다. 표본은 ethanol로 탈수시키고 Epon 812, dodecenyl scuccinioanhydride (DDSA), nadic methyl anhydride (NMA), tridimethyl amino-methyl phenol (DMP)-30을 혼합하여 포매한 다음, 극박 절단하여 uranyl acetate와 lead citrate로 염색한 후, 투과전자현미경 (M-7100: Hitachi, Japan)을 이용하여 관찰하였다.

(4) Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

① Total RNA 추출

방사선조사 후 *P. gingivalis* 실험균주의 fimbriae 유전자인 *fimA*와 superoxide dismutase (SOD) 유전자인 *sod* 발현의 변화를 전사수준에서 관찰하기 위한 RT-PCR를 시행하기 앞서 total RNA를 분리하였다. 우선 실험균주를 BHI 액체배지에 접종하여 37°C에서 혐기 상태로 24시간 배양한 다음 배양액 100 μL를 새 액체배지 100 mL 접종한 후 흡광도 600 nm에서 0.4가 될 때까지 배양하였다. 균 배양액을 40 Gy 방사선조사 후 즉시 1 mL씩 취하여 얼음에서 냉각시킨 RNase-free microcentrifuge tube에 옮긴 다음, Qiagen Total RNA Isolation Kit (Valencia, USA)를 사용하여 제조회사의 지시에 따라 total RNA를 추출하였다.

Table 1. Primers to be used in RT-PCR of *P. gingivalis*

Primers	Sequence (5′ to 3′)	Amplicon size (bp)
fimA-forward	GCT TTT GGA GTT GGC GAT GAC	1024
fimA-reverse	TTA CCA AGT AGC ATT CTG ACC	
sod-forward	CCT ATG TGG ACA ACC TCA AT	517
sod-reverse	GGC TTC CTT ATG TAT TGG TG	
gapA-forward	AAT ATC ATC CCC TCT TCC ACC	354
gapA-reverse	GTT GGA GTA TCC GAT TTC GTT	

② RT

Qiagen RT-PCR Kit를 사용하여 RT를 시행하였다. 정량하여 RNA 농도를 동일하게 맞춘 total RNA (50 ng-100 ng/mL), RNasin (40 Units/mL) 0.2 μL, 2 mM NTPs 2 μL, oligo dT primer (10 pmol) 1 μL, $MgCl_2$ (2-5 mM) 2-4 μL, RNase inhibitor (40 Units/mL) 1 μL를 혼합하고 증류수로 최종량이 20 μL가 되도록 조절한다. 이 RT 혼합액을 50°C에서 30분, 95°C에서 15분간 시행하고 4°C에서 반응을 정지시켜 cDNA를 얻었다.

③ PCR

방사선조사가 *P. gingivalis*의 병원성에 변화를 초래하는지를 관찰하기 위해 *P. gingivalis*의 병원성을 결정짓는데 중요한 독성인자를 대상으로 유전자 발현의 차이를 전사수준에서 관찰하였다. 우선 *P. gingivalis*의 *fimA* 염기서열을 토대로 하여 *fimA* 전체를 포함하는 primer를 제작하고, 또한 *sod*는 Nakayama[25]가 보고한 *P. gingivalais* ATCC 33277의 *sod* 염기서열 전체를 포함하는 primer를 제작하였다. 그리고 동량의 total RNA를 사용했는지를 확인하기 위한 대조유전자인 *gapA* 염기서열을 토대로 *gapA* 전체를 포함하는 primer를 제작하였다 (Table 1).

PCR을 위해 cDNA (10-50 ng/μL) 1-5 μL, primer 각각 10 pmol, Taq DNA polymerase (5 Units/μL; TaKaRa Korea) 0.25 μL, 2 mM dNTP 2-5 μL, 10 × buffer 2-5 μL, $MgCl_2$ (2-5 mM) 2-4 μL를 혼합하고 증류수로 최종량이 50 μL가 되도록 조절하였다. PCR 혼합액을 95°C에서 5분간 변성시킨 다음, PCR cycle은 94°C에서 30-60초, 52-55°C에서 30-60초, 72°C에서 60-90초로 25-30회 반복하고, 72°C에서 10분간 반응한 후 4°C에서 반응을 정지하여 PCR 산물을 얻었다. PCR 산물은 1% agarose gel에 전기영동한 후 ethidium bromide (0.5 μg/μL)로 염색한 다음, 자외선 하에서 나타난 띠

의 크기와 상대적인 양을 확인하였고, 확인한 결과는 사진 촬영으로 기록하였다.

(5) Immunoblot

방사선조사가 *P. gingivalis*의 단백질 및 기타 구성 물질 발현에 변화를 초래하는지를 관찰하기 위해 immunoblot을 시행하였다. 방사선을 조사한 *P. gingivalis* 실험 균주를 원심분리한 후 균체를 초음파파쇄기로 1분간 파쇄시킨 다음, 원심분리하여 얻은 상층액을 Bradford방법으로 정량하여 각 시료의 단백질 총량을 동일하게 조절하였다. 농도가 조절된 상층액 시료에 sample buffer를 첨가하여 100°C에서 10분간 처리한 후, SDS-10% polyacrylamide gel 상에서 전기영동하였다. 전기영동이 끝난 gel은 semi-Dry blotting unit (FB-SDB 2020, Fisher Scientific, USA)를 이용하여 1시간 동안 2.5 mA/cm^3 gel의 출력으로 nitocelluolose막(Bio-Rad Laboratories, USA)에 전이시켰다. 단백질이 전이되지 않은 부위의 nitocellulose막은 1% BSA-TBS (20 mM Tris-HCl [pH 7.5], 0.5 M NaCl)로 1시간 차단한 다음, 1% BSA-TBS에 1 : 500로 희석한 rabbit anti-*P. gingivalis* 2561 whole cell, 또는 rabbit anti-*P. gingivalis* 2561 fimbrillin 항혈청을 첨가한 후 4°C에서 하룻밤 반응시켰다. 이 후 nitocellulose 막을 Tris-Tween 20 완충용액 (10 mM Tris-HCl [pH 8.0], 0.05% Tween 20 [v/v], 0.01% NaN_3)으로 매 5분씩 3회 세정한 다음 1% BSA-TBS에 1 : 1,000으로 희석한 goat anti-rabbit IgG (H+L)-alkaline phosphatase conjugate (Sigma Chemicals, USA)로 상온에서 1시간 반응시켰다. 반응 후 Tris-Tween 20 완충요액으로 nitocellulose막을 매 10분씩 5회 세척한 다음, substrate BCIP/NPT (Sigma Chemicals, USA)로 처리하여 발색되는 단백질 띠를 관찰하였다.

4) 통계 처리

생균 수 측정과 항생제 감수성 검사는 triplicate로 시행하였으며, 대조군과 실험군간의 차이는 one way ANOVA로 통계적 유의성을 검증하였다.

결 과

1. 방사선조사에 의한 *P. gingivalis*의 생균 수 변화

대조군에서는 *P. gingivalis*의 생균수가 100 mL당 1.78×10^6이었으나, 10 Gy 조사군에서는 생균 수가 1.62×10^6으로 대조군에 비해 생균 수가 다소 감소하여 약 91%의 생존율을, 20 Gy 조사군에서는 생균 수가 1.10×10^6으로 62%의 생존율을, 30 Gy 조사군에서는 8.25×10^5으로 46%의 생존율을, 40 Gy 조사군에서는 3.20×10^5으로 17%의 생존율을 보여 방사선조사선량이 증가됨에 따라 생균 수가 급격하게 감소하였다 (Table 2). 각 군간의 생균 수의 차이는 모두 통계적으로 유의한 것으로 나타났다 ($P<0.05$).

2. 방사선조사에 의한 *P. gingivalis*의 항생제 감수성 변화

대조군에 비해 실험군에서 항생제 감수성이 방사선조사선량에 비례하여 약간씩 증가하는 경향을 보였다. Tetracycline의 경우 억제환의 직경이 대조군에서는 34 mm이었으나, 40 Gy 조사군에서는 38.6 mm로 측정되었고, penicillin의 경우에도 억제환의 직경이 대조군에서는 28.3 mm이었으나, 40 Gy 조사군에서는 32.7 mm로 측정되어 억제환의 직경이 각각 4.6 mm와 4.4 mm 증가되었다. Cefotaxime의 경우에는 대조군에서 억제환의 직경이 33.3 mm이었으나, 40 Gy 조사군에서는 36.3 mm로 측정되어 3.3 mm의 증가를 보였다. Amoxicillin의 경우 대조군과 40 Gy 조사군의 억제

Table 2. Effect of irradiation on viability of *P. gingivalis*

Radiation dose (Gy)	Number of viable cells (%)
0	1781±27 (100)
10	1622±74 (91)[a]
20	1101±119 (62)
30	825±84 (46)
40	320±22 (17)

P. gingivalis cells grown up to optical density of 0.4 at 600 nm were irradiated and 100 μL of the irradiated bacterial cells were smeared on an agar plate. Number of the viable cells (colony forming unit: CFU) was counted after the 48-h incubation. The results shown here are the representative of several experiments unless otherwise indicated.

[a]: number of viable cells at 10^{-3} dilution (% relative to the number of viable cells of control)

Table 3. Change in antibiotic sensitivity of *P. gingivalis* after irradiation

Antibiotics	Control	10 Gy	20 Gy	30 Gy	40 Gy
Amoxicillin (4 μg)	24.7 (±0.04)[a]	24.7 (±0.04)	23.0 (±0.04)	25.0 (±0.00)	26.7 (±0.04)*
Ampicillin (4 μg)	31.3 (±0.04)	31.0 (±0.00)	32.3 (±0.04)	31.7 (±0.04)	32.7 (±0.04)*
Penicillin (4 μg)	28.3 (±0.08)	28.7 (±0.04)	30.3 (±0.04)	32.7 (±0.04)	32.7 (±0.04)*
Cefotaxime (8 μg)	33.3 (±0.08)	34.0 (±0.00)	34.3 (±0.04)	36.0 (±0.00)	36.3 (±0.04)*
Tetracycline (8 μg)	34.0 (±0.07)	34.6 (±0.04)	36.3 (±0.08)	37.6 (±0.04)	38.6 (±0.04)*

Change in antibiotic sensitivity of the bacterium was determined by measuring inhibition zone created by discs containing different antibiotics.

[a]: the average diameter of the inhibition zone (mm) ± S.D.

*: Difference in the inhibition zone formed between non-irradiated and 40 Gy-irradiated *P. gingivalis* was observed to be statistically significant by one way ANOVA ($P<0.05$).

환의 직경을 비교한 결과, 각각 24.7 mm, 26.7 mm로 측정되어 40 Gy 조사군에서 2 mm의 증가를 보였다. Ampi-cillin

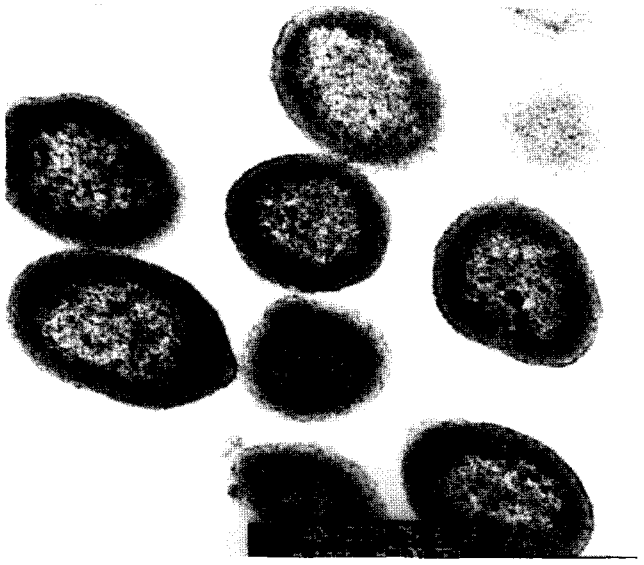

Fig. 1. A transmission electron microphotograph of *P. gingivalis* without irradiation. Bacterial cells of *P. gingivalis* grown up to optical density of 0.4 at 600 nm were harvested, fixed, embedded, ultrathin-sectioned, and then stained with uranyl acetate and lead citrate. Note that the inner and outer membranes of the cells are discernible and electron-dense ribosomes are scattered in the cytoplasm but more toward the cell membrane. Some cells have undergone degenerative change. The other cells in normal shape have highly electron-dense granules which are thought to be polyphosphate reserve materials. (× 40,000 mag.)

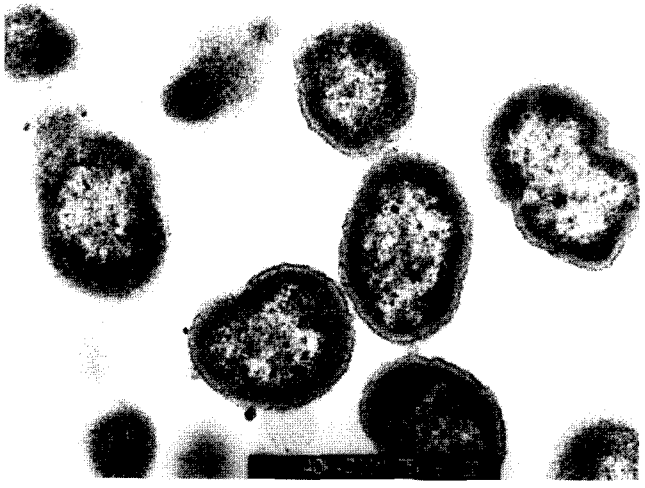

Fig. 2. A transmission electron microphotograph of *P. gingivalis* irradiated with a single absorbed dose of 10 Gy. Number of morphologically abnormal cells has increased. However, cells in normal shape are still found, in which granules of the high electron density are more distinctly detectable. (× 40,000 mag.)

의 경우 대조군이 31.3 mm, 40 Gy 조사군이 32.7 mm로 측정되어 40 Gy 조사군에서 1.4 mm가 증가한 것으로 나타났다(Table 3). 대조군과 40 Gy 조사군의 억제환 직경의 변화를 one way ANOVA로 검증한 결과, 모두 통계적으로 유의한 것으로 나타났다($P<0.05$).

3. 방사선조사에 의한 *P. gingivalis*의 형태 변화

대조군의 *P. gingivalis*를 투과전자현미경으로 관찰하였을 때, 내막과 외막이 뚜렷하게 관찰되었고, 리보솜이 세포막 쪽으로 편중된 상태로 균일한 밀도를 갖는 정상적인 형태를 보였다. 일부 균은 막이 소실되는 등 변성 현상이 나타났고, 또 다른 균에서는 세포질 내에 전자밀도가 높은 과립이 관찰되었다(Fig. 1). 이에 비해 실험군에서는 방사선조사선량이 증가됨에 따라 비정상적인 형태를 갖는 균이 상대적으로 많이 증가되었다. 10 Gy 조사군에서는 비정상적인 형태 변화를 보이는 균들이 증가하였는데, 대조군에 비해 변성된 세균들이 많아졌으나, 전형적인 세포 모양을 갖고 있는 균들도 존재하였다. 또한 정상 형태를 갖는 균에서는 전자밀도가 높은 과립의 출현이 더욱 뚜렷하게 관찰되었다(Fig. 2). 20 Gy 조사군에서는 두 개의 막 사이의 공간이 넓게 나타났고, 세균세포의 내부는 전자밀도가 보다 높게 나타났다. 또한 세균의 외부가 불규칙한 파동형태를 보이기도 하였다. 일부의 세균은 세포막과 내부 원형질의 분리현상도 관찰되었다(Fig. 3). 30 Gy 조사군에서는 변

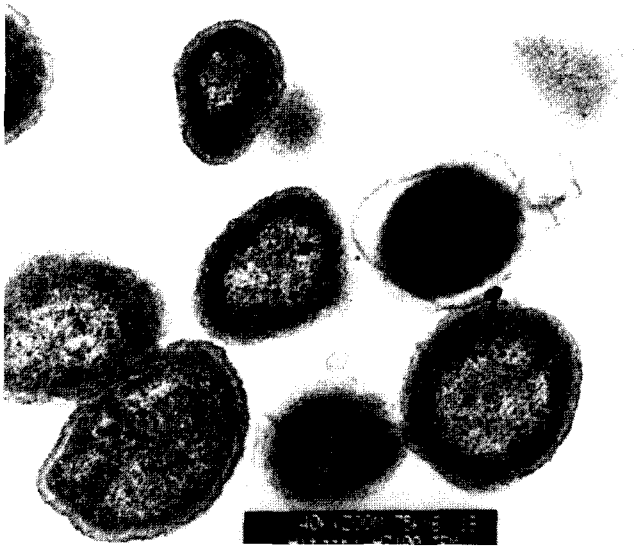

Fig. 3. A transmission electron microphotograph of *P. gingivalis* irradiated with a single absorbed dose of 20 Gy. Cells with the electron-densely stained cytoplasm are predominant. The cells also have distinct nucleoid and the widened space between the two membranes. Irregular waveform of the outside envelope of the cell is discernible. Separation of the cell membranes from the cytoplasm is undergoing in the degraded cell. (× 40,000 mag.)

Fig. 4. A transmission electron microphotograph of *P. gingivalis* irradiated with a single absorbed dose of 30 Gy. Some cells show that the cytoplasmic contents are completely leaked out, leaving two distinct membranes. Inside these ghost cells highly electron-dense granules are more prominent and extracellular vesicles of the outer membrane are found near the ghost cells. Cells with normal morphology still have the widened space between the membranes and the electron-dense granules. (× 30,000 mag.)

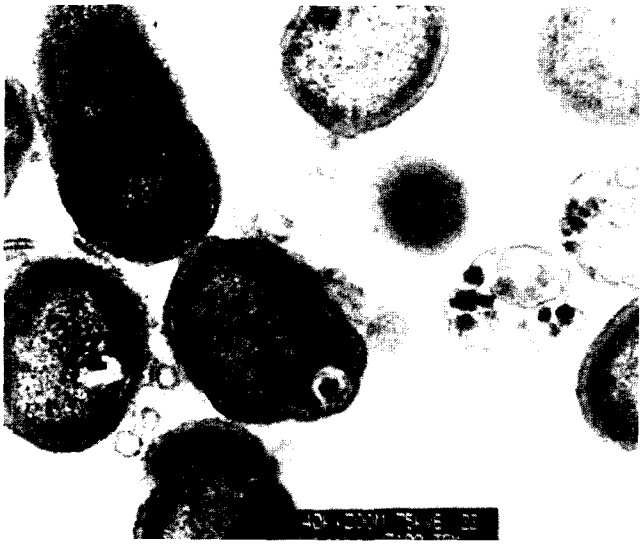

Fig. 5. A transmission electron microphotograph of *P. gingivalis* irradiated with a single absorbed dose of 40 Gy. Shape of the cells with 40 Gy irradiation appear to be similar to that of those with 30 Gy. More vesicles are observed. (× 40,000 mag.)

성이 진행되어 원형질을 완전히 소실한 유령세포도 관찰되었다. 정상적인 세포모양을 아직 유지하고 있는 세균에서는 여전히 두 개의 막 사이의 공간이 넓어져 있고 전자밀도가 높은 과립이 보다 많이 관찰되었다(Fig. 4). 40 Gy

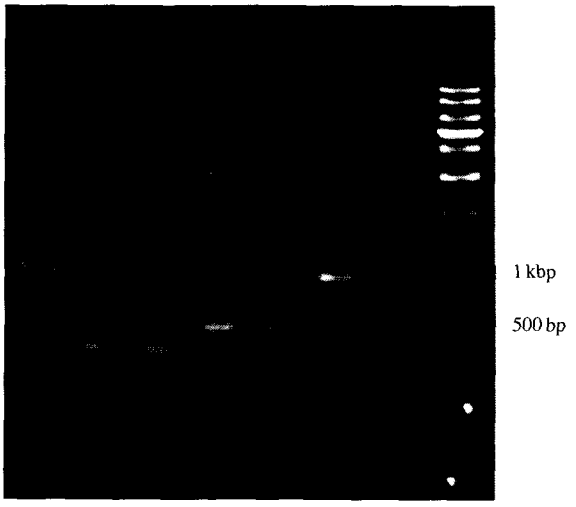

Fig. 6. RT-PCR analysis of expression of *fimA* and sod in *P. gingivalis* with or without irradiation. *P. gingivalis* was irradiated and further incubated for 2 h. The cultured cells of *P. gingivalis* were centrifuged to collect the cell pellet. Total RNA was extracted from the cell pellet and subjected to RT-PCR as described in the text. *gapA* was used to confirm that the same amount of the amplified gene was loaded in each lane. Lanes: M1, 100 bp DNA markers; lanes 1 and 2, RT-PCR product of *gapA*; lanes 3 and 4, RT-PCR product of *sod*; lanes 5 and 6, RT-PCR product of *fimA*; M2, 1 kbp DNA markers. Lanes 1, 3 and 5, *P. gingivalis* without irradiation; lanes 2, 4 and 6, *P. gingivalis* irradiated with 40 Gy.

조사군에서는 30 Gy 조사군과는 상이하게 균의 외막이 돌출되어 생성되는 소포가 다량으로 관찰되었다(Fig. 5).

4. 방사선조사에 의한 *P. gingivalis*의 *fimA*와 *sod* 발현의 변화

*P. gingivalis*의 독성인자인 *fimA* 유전자나 *sod* 유전자의 발현을 RT-PCR로 분석한 결과, 40 Gy 조사군의 *P. gingivalis*는 대조군의 *P. gingivalis*에 비해 *fimA* 유전자와 *sod* 유전자의 발현이 감소하였다(Fig. 6).

5. 방사선조사에 의한 *P. gingivalis*의 단백질 profile의 변화

40 Gy 조사군의 *P. gingivalis* 2561의 단백질 profile을 *P. gingivalis* whole cell에 대한 항혈청을 사용한 immunoblot으로 관찰한 결과, 많은 변화가 있는 것으로 나타났다(Fig. 7A). 방사선조사에 의해 증가한 단백질은 약 140 kDa 크기의 단백질로, 방사선조사선량의 변화와 상관없이 동일한 정도의 증가를 보였다. 약 15 kDa 크기의 단백질은 방사선이 조사되기 이전에는 나타나지 않았으나, 방사선조사가 시작되면서 나타났다. 반면에 36 kDa, 23 kDa 및 17 kDa 단백질은 방사선이 조사되면서부터 관찰되지 않았다. 또한 immunoblot에서 가장 뚜렷하게 관찰되는 약 50 kDa 크기

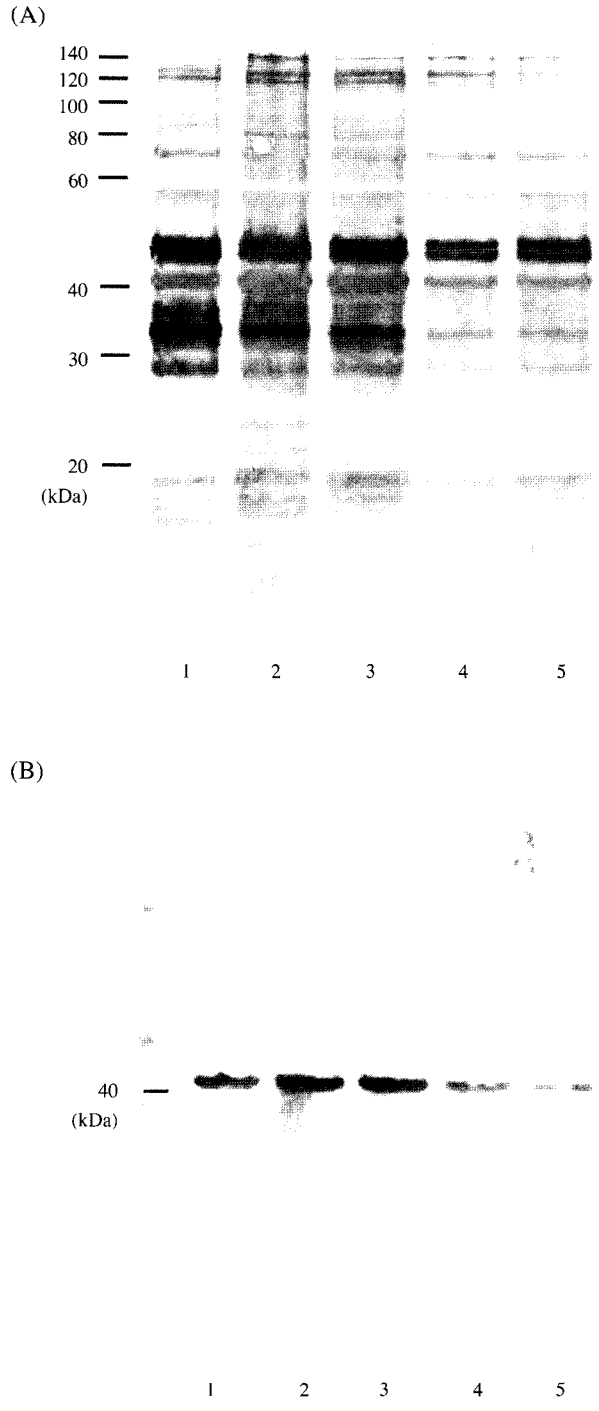

Fig. 7. Immunoblot analysis of *P. gingivalis* with or without irradiation. *P. gingivalis* was irradiated and further incubated for 6 h. The cultured cells of *P. gingivalis* were centrifuged to collect the cell pellet, boiled in sample buffer for 10 min and subjected to electrophoresis on an SDS-4-10% gradient polyacrylamide gel. The separated proteins on the gel were transferred to a nitrocellulose membrane, which was incubated with anti-*P. gingivalis* whole cell (A) and anti-*P. gingivalis* fimbrillin (B), followed by goat anti-rabbit IgG (H+L)-alkaline phosphatase. Lanes: 1, *P. gingivalis* without irradiation; 2, *P. gingivalis* irradiated with 10 Gy; 3, *P. gingivalis* irradiated with 20 Gy; 4, *P. gingivalis* irradiated with 30 Gy; 5, *P. gingivalis* irradiated with 40 Gy.

인 두 개의 단백질과 35 kDa 단백질은 방사선조사에 의해 감소하였으나, 방사선조사선량에 따른 차이는 크지 않았다. 한편 120 kDa, 43 kDa, 33 kDa 및 28 kDa 단백질은 방사선조사선량의 증가에 따라 발현양이 감소하였다. 약 120 kDa 크기의 단백질은 10 Gy 조사군과 20 Gy 조사군에서는 관찰되었으나, 30 Gy 조사군과 40 Gy 조사군에서는 나타나지 않았다. 이와 비슷하게 약 125 kDa 크기의 단백질도 10 Gy 조사군과 20 Gy 조사군간에는 큰 차이가 없었으나, 30 Gy 조사군과 40 Gy 조사군에서는 발현양이 급격하게 감소하였다. 방사선조사선량이 증가되면서 단백질 발현양이 감소한 43 kDa 단백질은 fimbriae의 단량체인 fimbrilln의 크기와 같아 fimbrillin으로 추측되었다. 이를 확인하기 위해 fimbrillin에 대한 항혈청으로 immunoblot을 시행한 결과, 뚜렷한 면역반응이 나타남으로써 43 kDa 단백질은 fimbrillin으로 확인되었다 (Fig. 7B).

고 찰

구강균총은 타액, 항생제 사용 여부, 구강 위생상태, 탄수화물의 섭취빈도, 숙주의 방어기전 등에 의해 영향을 받는데, 이 중 타액이 가장 중요한 요인으로 간주되고 있다.[2,20] 따라서 타액선에 방사선이 조사되면 타액선의 기능 이상이 유발되어 타액의 분비량 감소와 타액의 구성성분 변화로 인해 구강균총의 급격한 변화가 나타나고, 구강질환의 발병 위험이 높아진다.[26,27] 특히, 치은연하 열구부위에서 치주질환과 관련된 그람음성 및 혐기성 간균과 방추상 세균이 현저히 증가될 뿐만 아니라,[28] 치주조직에 대한 방사선 조사로 인해 치은의 출혈, 치주인대의 변성, 치조골의 흡수 등이 유발된다.[18,29]

이와 같이 두경부 방사선치료 시에는 방사선에 의한 치주조직의 손상, 그리고 타액의 분비 감소, 타액 성분의 변화와 함께 치주질환유발 병원균의 증가로 인해 치주질환의 발현이 증가되므로 본 연구에서는 급진성 치주염의 주요병원균인 *P. gingivalis*[14,30]를 대상으로 타액선의 기능에 영향을 미치는 10 Gy, 20 Gy, 30 Gy 및 40 Gy의 흡수선량[20,31]을 각각 조사하여 방사선이 실험균주에 미치는 영향을 관찰하였다.

본 연구에서는 우선 실험균주에 대한 방사선의 직접적인 살균효과를 관찰하기 위해 방사선조사 후 *P. gingivalis*의 생균 수를 측정하였는데, 대조군에 비해 실험군에서는 10 Gy 조사군에서 약 91%의 생존율을, 20 Gy 조사군에서는 62%의 생존율을, 30 Gy 조사군에서는 46%의 생존율을, 그리고 40 Gy 조사군에서는 17%의 생존율을 보여 방사선조사선량의 증가에 따라 *P. gingivalis*의 방사선감수성도 증가하는 것으로 나타났다. 그러나 임상적으로 두경부 방사선치료 시에는 방사선에 의해 치주조직의 국소적 면역력이 감소되고 타액선의 기능이 손상된 경우 치주낭에서 치

주질환유발 병원균의 집락화가 급속히 진행되는데,[12,28] 이는 본 연구결과로 미루어, 방사선조사선량의 크기만큼 직접적인 물리적 파괴 효과로 인해 일시적으로 *P. gingivalis*가 감소하지만, 방사선조사 후 일정시간이 경과하면 *P. gingivalis*는 다시 생활력을 회복하는 동시에 방사선조사에 따른 치주조직의 직접적인 손상, 구강건조증, 구강균총의 변화로 인해 오히려 치주질환이 유발, 또는 심화되는 것으로 사료된다.

치주질환유발 병원균을 억제하기 위한 약제의 효과는 임상적으로 중요한 관심의 대상이 되어 왔다. 본 연구에서는 방사선조사 후 *P. gingivalis*의 항생제에 대한 감수성 변화를 관찰한 결과, 대조군에 비해 실험군에서 방사선조사선량이 증가됨에 따라 항생제 감수성이 대체로 증가하는 경향을 보였다. 특히, tetracycline, penicillin 및 cefotaxime의 경우 40 Gy 조사군에서 항생제 감수성의 증가가 다른 항생제에 비해 뚜렷하였다.

본 연구에서는 이러한 방사선조사에 의한 세균의 항생제 감수성의 변화는 세균의 구조적, 형태적 변화 등과 밀접한 관계가 있을 것으로 판단되어 방사선조사 후에 나타나는 *P. gingivalis*의 세포막, 세포질 내 구조 등을 투과전자현미경으로 관찰하였다. 본 대조군에 비해 10 Gy 조사군에서 비정상적인 형태를 보이는 변성된 세균이 증가하였으나, 세포분열 중인 세균 등 정형적인 세포모양을 가지고 있는 *P. gingivalis*도 존재하였고, 전자밀도가 높은 과립도 뚜렷하게 관찰되었다. 20 Gy 조사군에서는 *P. gingivalis*의 변성이 더욱 진행되어 두 개의 막과 막 사이의 공간이 넓게 나타났고, 세균의 외부가 불규칙한 파동형태를 보여 방사선조사선량의 증가에 따라 세포막의 변성이 더욱 진행되는 과정을 관찰할 수 있었다. 일부 세균에서는 세포막과 내부 원형질의 분리현상도 관찰되었으며, 변형된 세균세포도 더욱 증가되었다. 30 Gy와 40 Gy 조사군에서는 원래의 세포모양을 완전히 상실한 세균세포가 더욱 증가하였으며, 원형질을 완전히 소실한 유령세포의 형태도 관찰되었다. 특히, 40 Gy의 조사군에서는 *P. gingivalis*의 외막이 돌출되어 생성되는 많은 소포들이 다량으로 관찰되었다. 이와 같이 본 연구에서는 방사선조사로 인한 *P. gingivalis*의 형태적 변화와 함께 20 Gy 조사군에서부터 생균 수의 현저한 감소가 나타났고, 방사선조사선량이 증가됨에 따라 변형된 세균의 수가 증가되어 항생제 감수성에도 영향을 미쳤을 것으로 생각된다.

한편 방사선유발 구강건조증 시에는 *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus*, *Staphylococcus* 및 *Candida*와 같은 산생성 미생물의 수의 증가와 함께 *Actinomyces*의 수도 증가하는데,[19,20] 치면에 세균막이 형성되면 *Streptococcus*, *Actinomyces*와 같은 세균들이 증가하여 *Streptococcus*에 의해 합성된 포도당중합체에 의해 서로 응집하고, *Actinomyces*의 증가가 지속적으로 이루어지며, *Actinomyces*에 그람음성 세균들이 부착하게 된다. *Actinomyces*에 부착하는 세균으로는 *Fusobacterium nucleatum*, *Eikenella corrodens*, *P. gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella melaninogenicus* 등이다. 일반적으로 그람음성 세균은 치아표면이나 치은조직에 부착능이 거의 없으므로 그람양성 세균에 결합하여 치은 연하부위에서 세균의 집락을 형성한다. 그러나 *P. gingivalis*의 경우에는 부착물질인 fimbriae를 이용하여 구강조직에 흡착된 타액분자, 기질단백질, 상피세포, 치면과 상피표면의 세균막 등에 부착함으로써, 치주조직의 치은연하 부위에서 군체 형성이 이루어진다. *P. gingivalis*는 당을 에너지원으로 사용하지 않기 때문에 당분해능은 없으나, hemin으로부터 철분과 펩티드를 얻어 에너지원과 성장을 위해 사용한다. 이 과정을 위해 *P. gingivalis*는 최소 세 종류의 적혈구응집소와 다섯 종류의 단백분해효소를 생성하는데, 이 단백분해효소가 치주조직을 파괴시키는 것으로 보고되고 있다.[32,33]

본 연구에서는 방사선조사가 *P. gingivalis*의 병원성을 변화시키는지 관찰하기 위해 RT-PCR을 이용하여 *fimA*의 발현양상을 대조한 결과, 40 Gy를 조사한 *P. gingivalis*는 *fimA* 유전자 발현이 감소하였다. 또한 Immunoblot의 결과도 *P. gingivalis*의 43-kDa의 fimbrillin 단백질의 발현양이 방사선조사선량이 증가됨에 따라 감소되는 것으로 나타났다. 이 외에도 방사선에 의해 많은 단백질이 감소하였고, 일부의 단백질은 방사선조사 후 immunoblot에서 전혀 검출되지 않았다. 반면에 방사선조사 후, 증가하는 단백질도 있었으나 감소하는 단백질보다는 그 수가 적었는데, 특이하게 15 kDa 단백질은 오히려 방사선조사 후 검출되는 것으로 나타났다. 방사선조사가 *P. gingivalis*에 대한 위해기전을 이해하기 위해서는 향후 방사선조사로 인해 나타난 단백질을 동정하고, 이의 기능을 규명하는 연구가 진행되어야 할 것이다. 한편 세균에게 독이 되는 superoxide를 분해하며, 상대적으로 독작용이 적은 과산화수소를 변화시키는 효소인 SOD 유전자 *sod*는 *P. gingivalis*의 생존에 필요한 독력인자이다. RT-PCR 결과, *sod*의 발현은 방사선조사 후 감소하는 것으로 나타났다. 따라서 중요 독성인자인 *fimA* 유전자와 *sod* 유전자, 그리고 fimbrillin 단백질 등 일부 단백질 profile의 변화는 방사선조사 후 *P. gingivalis*의 형태변화, 결과적으로는 생존율 저하에 관여하였을 것으로 판단된다.

이상의 연구결과, *P. gingivalis*에 방사선이 조사된 경우, 생균 수의 감소, 항생제의 감수성의 증가 및 균의 비정상적인 구조적, 형태적 변화가 유발되었으나, 이러한 변화들이 실제 두경부 방사선치료 환자들의 치주조직에 미치는 영향에 대해서는 환자들의 치주질환 발현양상에 대한 장기적인 추적조사 등을 통한 더욱 상세한 연구와 더불어, *P. gingivalis*에 영향을 미치는 다양한 환경적, 면역적 요인에 대해서도 추가적인 연구가 진행되어야 할 것으로 생각된

다. 또한 방사선에 의한 치주질환의 여러 다양한 병인과 관련해서는 임상적으로 철저한 구강위생과 스케일링, 치근활택술, 주기적인 chlorohexidine 구강세정, 국소적 불소도포 등을 시행함은 물론, 방사선유발 구강건조증 등과 같은 방사선에 의한 단기적, 또는 장기적 합병증의 예방에 중점을 두어야 할 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Epstein JB, Emerton S, Le ND, Stevenson-Moore P. A double-blind crossover trial of oral balance gel and biotene toothpaste versus placebo in patients with xerostomia following radiation therapy. Oral Oncol 1999; 35 : 132-7.
2. Almstahl A, Wikstrom M. Oral microflora in subjects with reduced salivary secretion. J Dent Res 1999; 78 : 1410-6.
3. Almstahl A, Wikstrom M, Stenberg I, Jakobsson A, Fagerberg-Mohlin B. Oral microbiota associated with hyposalivation of different origins. Oral Microbiol Immunol 2003; 18 : 1-8.
4. Mossman KL. Quantitative radiation dose-response relationships for normal tissues in man. II. Response of the salivary glands during radiotherapy. Radiat Res 1983; 95 : 392-8.
5. Frank RM, Herdly J, Philippe E. Acquired dental defects and salivary gland lesions after irradiation for carcinoma. J Am Dent Assoc 1965; 70 : 868-83.
6. Chencharick JD, Mossman KL. Nutritional consequences of the radiotherapy of head and neck cancer. Cancer 1983; 51 : 811-5.
7. Karlsson G. The relative change in saliva secretion in relation to the exposed area of the salivary glands after radiotherapy of head and neck region. Swed Dent J 1987; 11 : 189-94.
8. Eneroth CM, Henrikson CO, Jakobsson PA. Effect of fractionated radiotherapy on salivary gland function. Cancer 1972; 30 : 1147-53.
9. Marques MA, Dib LL. Periodontal changes in patients undergoing radiotherapy. J Periodontol 2004; 75 : 1178-87.
10. Tong HC, Gao XJ, Dong XZ. Non-mutans streptococci in patients receiving radiotherapy in the head and neck area. Caries Res 2003; 37 : 261-6.
11. Grotz KA, Genitsariotis S, Vehling D, Al-Nawas B. Long-term oral *Candida* colonization, mucositis and salivary function after head and neck radiotherapy. Support Care Cancer 2003; 11 : 717-21.
12. Tseng CC, Wolff LF, Rhodus N, Aeppli DM. The periodontal status of patients with Sjögren's syndrome. J Clin Periodontol 1990; 17 : 329-30.
13. Almstahl A, Kroneld U, Tarkowski A, Wikstrom M. Oral microbial flora in Sjögren's syndrome. J Rheumatol 1999; 26 : 110-4.
14. Kuru B, McCullough MJ, Yilmaz S, Porter SR. Clinical and microbiological studies of periodontal disease in Sjögren syndrome patients. J Clin Periodontol 2002; 29 : 92-102.
15. Najera MP, al-Hashimi I, Plemons JM, Rivera-Hidalgo F, Rees TD, Haghighat N, et al. Prevalence of periodontal disease in patients with Sjögren's syndrome. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 1997; 83 : 453-7.
16. Boutsi EA, Paikos S, Dafni UG, Moutsopoulos HM, Skopouli FN. Dental and periodontal status of Sjögren's syndrome. J Clin Periodontol 2000; 27 : 231-5.
17. Brown LR, Dreizen S, Handler S, Johnston DA. Effect of radiation-induced xerostomia on human oral microflora. J Dent Res 1975; 54 : 740-50.
18. Beumer J 3rd, Curtis T, Harrison RE. Radiation therapy of the oral cavity: sequelae and management. Head Neck Surg 1979; 1 : 301-12.
19. Llory H, Dammron A, Gioanni M, Frank RM. Some population changes in oral anaerobic microorganisms, *Streptococcus mutans* and yeasts following irradiation of the salivary glands. Caries Res 1972; 6 : 298-311.
20. Ahn KD, Kim GT, Choi YS, Hwang EH. Effect of irradiation on the *Streptococcus mutans*. Korean J Oral Maxillofac Radiol 2007; 37 : 35-44.
21. Yusof ZW, Bakri MM. Severe progressive periodontal destruction due to radiation tissue injury. J Periodontol 1993; 64 : 1253-8.
22. Dreizen S. Stomatotoxic manifestations of cancer chemotherapy. J Prosthet Dent 1978; 40 : 650-5.
23. Takai N, Shinohara M, Yoshida Y, Ohura K, Mori M, Kakudo Y. Effect of streptozotocin diabetes on gingivitis in plaque-susceptible rats. J Dent Res 1986; 65 : 49-52.
24. Johnson RB, Thliveris JA. Effect of low-protein diet on alveolar bone loss in streptozotocin-induced diabetic rats. J Periodontol 1989; 60 : 264-70.
25. Nakayama K. Molecular genetics of *Porphyromonas gingivalis*: gingipains and other virulence factors. Curr Protein Pept Sci 2003; 4 : 389-95.
26. Crow HC, Ship JA. Are gingival and periodontal conditions related to salivary gland flow rates in healthy individuals? J Am Dent Assoc 1995; 126: 1514-20.
27. Keene HJ, Fleming TJ. Prevalence of caries-associated microflora after radiotherapy in patients with cancer of the head and neck. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1987; 64 : 421-6.
28. Leung WK, Jin LJ, Samaranayake LP, Chiu GK. Subgingival microbiota of shallow periodontal pockets in individuals after head and neck irradiation. Oral Microbiol Immunol 1998; 13 : 1-10.
29. Carl W. Oral complications in cancer patients. Am Fam Physician 1983; 27 : 161-70.
30. Ando Y, Aoki A, Watanabe H, Ishikawa I. Bactericidal effect of erbium YAG laser on periodontopathic bacteria. Lasers Surg Med 1996; 19 : 190-200.
31. Kuten A, Ben-Aryeh H, Berdicevsky I, Ore L, Szargel R, Gutman D, et al. Oral side effects of head and neck irradiation: correlation between clinical manifestations and laboratory data. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1986; 12 : 401-5.
32. Walker T. Microbiology. Philadelphia: WB Saunders Co; 1998. p. 287-8.
33. Prescott L, Harley J, Klein D. Microbiology. 6th ed. Dubuque: McGraw-Hill Higher Education; 2005. p. 911-4.